白花地胆草单体 EM-12 诱导 2774-C10 细胞 G_1/S 期阻滞及细胞凋亡的分子机制研究

黄翔[1]，杨杰[1]，何佩彦[1]，吴志慧[1]，曾慧兰[2]，王新宁[3**]，蒋建伟[1**]

（1 暨南大学医学院 广州 510632；2 暨南大学附属第一医院血液内科 广州 510632；3 广东药学院附属第一医院肿瘤科 广州 510080）

摘要：目的:研究白花地胆草（*Elephantopus mollis H. B. K*）的乙醇提取物 EM-12 抗肿瘤作用分子机制。方法:MTT 检测 EM-12 对卵巢癌细胞活性影响；克隆形成抑制实验检测 EM-12 对卵巢癌细胞增殖能力的影响；GSEA（Gene set enrichment analysis）分析 EM-12 对卵巢癌 2774-C10 细胞的影响；PI 单染检测细胞周期；Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡；Western blotting 检测细胞凋亡、周期相关蛋白。结果:MTT 实验结果表明，EM-12 可以显著抑制卵巢癌细胞的活性;RNA-seq 及 GSEA 分析表明 EM-12 诱导 2774-C10 发生 G_1/S 期阻滞；克隆形成抑制实验结果表明,EM-12 可以显著抑制卵巢癌细胞的增殖；流式细胞术结果表明随着药物浓度的增加,凋亡率逐渐增加,并且 G_1 期细胞比例逐渐增加，S 期细胞比例减少，发生 G_1/S 期阻滞。Western blotting 结果表明,随着药物浓度的增加 cyclin E_2、Cyclin D_1、CDK2、CDK6 蛋白水平下降 ,并伴随 caspase-8、Caspase-3 活化及多聚 ADP 核糖聚合酶 PARP 酶切失活。 结论:EM-12 诱导卵巢癌细胞发生 G_1/S 期阻滞,且通过死亡受体通路诱导细胞凋亡。

关键词：白花地胆草，卵巢癌，凋亡，死亡受体通路，G_1/S 期阻滞

卵巢癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤[1]，死亡率位居妇科恶性肿瘤第一位[2]。复发与转移严重的影响了卵巢癌患者的预后，卵巢癌患者的五年生存率仅仅只有 35%-38%[3]。卵巢癌的治疗方式主要以手术治疗为主,放疗及化疗为辅助。紫杉醇和顺铂是卵巢癌最常见的化疗药物,卵巢癌病人在首次使用紫杉醇进行化疗时可以取得很好的疗效。但是,有部分病人在肿瘤复发后对紫杉醇产生耐药性,大大降低了患者的五年生存率。因此，寻找新的抗肿瘤药物对卵巢癌的治疗具有重要的临床意义。

白花地胆草(*Elephantopus mollis H. B. K*)属于菊科地胆草属植物，在临床上多用于感冒、扁桃体炎、肝炎、腹泻和胃病等疾病的治疗[4]。其所含化学成分类型较多，倍半萜内酯是其主要的活性成分[5]。本课题组已有研究报道，其有效成分倍半萜内酯单体 EM-3 通过 stat3 通路诱导鼻咽癌细胞凋亡和 G_2/M 期阻滞并降低 sp 细胞比例[6]；Shao FY 报道了倍半萜内酯单体 EM-23 可以通过靶向硫氧还蛋白激活 JNK 和细胞死亡通路介导宫颈癌细胞凋亡[7]。

本课题组采用 MTT 筛选白花地胆草中抗肿瘤活性成分单体，从白花地胆草中分离出 25 种单体，筛选出其中抗肿瘤活性明显的单体化合物 EM-3、EM-12、EM-23 等,由于 EM-3 和 EM-23 的抗肿瘤作用机制已被报道。所以,我们以 EM-12 作为候选化合物，见图 1。本研究目的在于探索 EM-12 对人卵巢癌细胞 2774-C10 细胞的抗肿瘤机制，并且为 EM-12 进入动物及临床研究提供实验依据。

* 广州市科技计划项目（项目编号 201607010372）、广东省自然科学基金（ 项目编号 2014A030313356）、广东省中医药管理局建设中医药强省科研课题（项目编号 2015118）、华南肿瘤学国家重点实验室开放课题（项目编号 HN2017-01）资助项目

**通讯作者，电子信箱: wangxn1229@126.com; jjw703@163.com

图 1 EM-12 单体的化学结构

Fig.1 The chemical structure of EM-12 monomer

1 材料与方法

1.1 材料

白花地胆草单体 EM-12 为本课题组库存分子。2774-C10（人卵巢癌细胞）和 LO2（人正常肝细胞）由中山大学肿瘤防治中心提供。cyclin E_2、Cyclin D_1、CDK2、CDK6 、Caspase-8、Caspase-3、PARP 一抗均购自 Cell signaling techonogly 公司，凋亡试剂盒购自 Becton,Dickinson and Company，细胞周期检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司，MTT 购买自 sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

2774-C10 和 LO2 细胞用 DMEM 培养液（含 10%FBS）于 37℃、5%CO2 的恒温培养箱常规培养。细胞融合度达 80%，用胰酶消化传代细胞。

1.2.2 MTT 检测细胞活性

取处于对数生长期的细胞种入 96 孔板中，每孔 100 μl 细胞悬液，3500 个细胞/孔，细胞贴壁后加入药物稀释液 100 μl，每组 3 个平行孔，放置于培养箱培养 48h。每孔加入 10μl 的 MTT（5g/L），37℃孵育 4h，弃上清，每孔加入 100 μl 的 DMSO，结晶溶解后使用酶标仪检测 570nm 波长下每孔的 OD 值，计算细胞活性。

细胞活性（%）=OD（实验组）/OD（对照组）×100%

1.2.3 克隆形成实验

将处于对数生长期的 2774-C10 细胞用胰酶消化，再用 DMEM 培养液重悬，种于 6 孔板中，每孔 1000 个细胞。待细胞贴壁后，使用药物处理，DMSO 为对照组。置于培养箱中培养 7 天后弃去上清，用 PBS 洗 2 遍，再用 4%多聚甲醛固定 10min，吸去固定液，用 0.1%结晶紫染色 30min，冲洗，晾干，拍照。

1.2.4 GSEA 分析

将对数生长期的 2774-C10 细胞种于 6 孔板，贴壁后，使用药物处理，DMSO 为对照组，24h 后，弃去上清。用 PBS 洗 2 遍，用 1mL trizol 冰上裂解细胞 5min，5min 后将裂解液转入新的 EP 管中，加入 400 μl 的氯仿，震荡混匀后，室温静置 10min。4℃，12000rpm 离心 15min。吸取上层水相置于新的 EP 管中，加入

等体积的异丙醇，混匀，室温放置 10min。4℃，12000rpm 离心 15min，弃上清，使用 DEPC 水配置的 75%乙醇洗涤沉淀，室温晾干。使用 30μl DEPC 水溶解沉淀，测定浓度。使用华大基因 BGI-500 平台进行 RNA-seq 测序，对测序结果进行 GSEA 分析。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期

将对数生长期的 2774-C10 细胞种于 6 孔板，贴壁后，使用药物处理，DMSO 为对照组，24h 后，弃去上清。收集贴壁细胞于离心管中，1500r/min，离心 5min 收集细胞，PBS 洗 2 遍。用 70%的乙醇固定过夜，1500r/min，离心 5min 收集细胞，PBS 洗 2 遍。使用 100μlRNase A 重悬细胞，置于 37℃，孵育 30min。加入 400μl PI,4℃避光孵育 30min。用细胞筛过滤细胞，将细胞转入流式管中，上机检测。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

将对数生长期的 2774-C10 细胞种于 6 孔板，贴壁后，使用药物处理，DMSO 为对照组，48h 后，收集上清及贴壁细胞于离心管中，1500r/min，离心 5min 收集细胞，PBS 洗 2 遍，使用 binding buffer 重悬细胞，加入 5μl Annexin V-FITC 和 PI，避光，室温孵育 15min，上机检测。

1.2.7 Western blotting 检测相关信号通路蛋白

将对数生长期的 2774-C10 细胞种于 6 孔板，贴壁后，使用药物处理，DMSO 为对照组，24h 后，弃去上清。用 PBS 洗 2 遍，使用 120μl 的 RIPA 裂解液冰上裂解 15min。进行超声。超声后，于 4℃，12000rpm/min 离心 15min，吸取上清置新的 EP 管中，BCA 法测定蛋白浓度。取 25μg/样品蛋白进行电泳，转膜，封闭。一抗 4℃孵育过夜，使用 TBST 洗膜，洗 3 次，每次 10min。二抗室温孵育 2h，使用 TBST 洗膜，洗 3 次，每次 10min。化学发光后，使用 bio-rad 发光仪拍照。

1.2.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行统计学分析。数据以均数±标准差表示，所有实验均进行 3 次独立实验，$P<0.05$ 具有显著差异。

2 结果

2.1 EM-12 对卵巢癌细胞的细胞毒作用

利用 MTT 法检测 EM-12 对卵巢癌细胞 2774-C10 的细胞毒作用，见图 2。结果显示 EM-12 对 2774-C10 细胞具有显著细胞毒作用，且呈梯度依赖性，且对人正常肝细胞 LO2 的细胞毒作用远低于对 2774-C10 细胞的细胞毒作用。

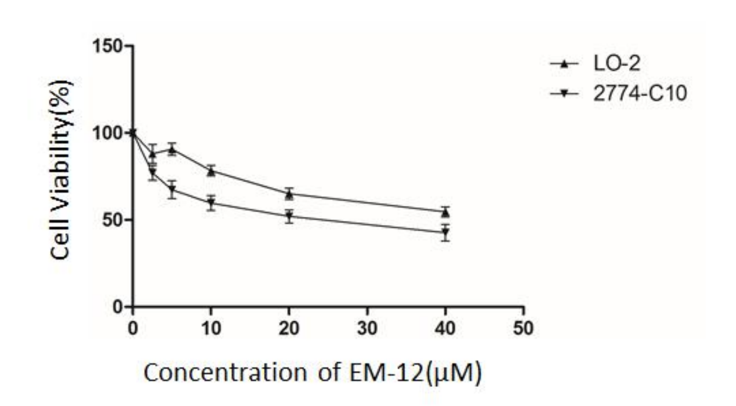


图 2 EM-12 对卵巢癌 2774-C10 细胞的活性影响

Fig.2 Effect of EM-12 on cell viability of 2774-C10 cell

2.2 EM-12 对卵巢癌细胞增殖的抑制

EM-12 作用 2774C-10 细胞 7 天，与对照组相比，随着药物浓度增加，细胞克隆数目显著减少，并且单克隆的细胞数目显著减少。对照组中，细胞生长状态佳，饱满透亮，形态正常。当药物浓度为 0.5μmol /L 时，细胞生长状态差，细胞开始变圆。当药物浓度为 1μmol /L 时，镜下只能观察到零星的细胞，细胞克隆形成能力几乎完全被抑制，见图 3（a~d）。

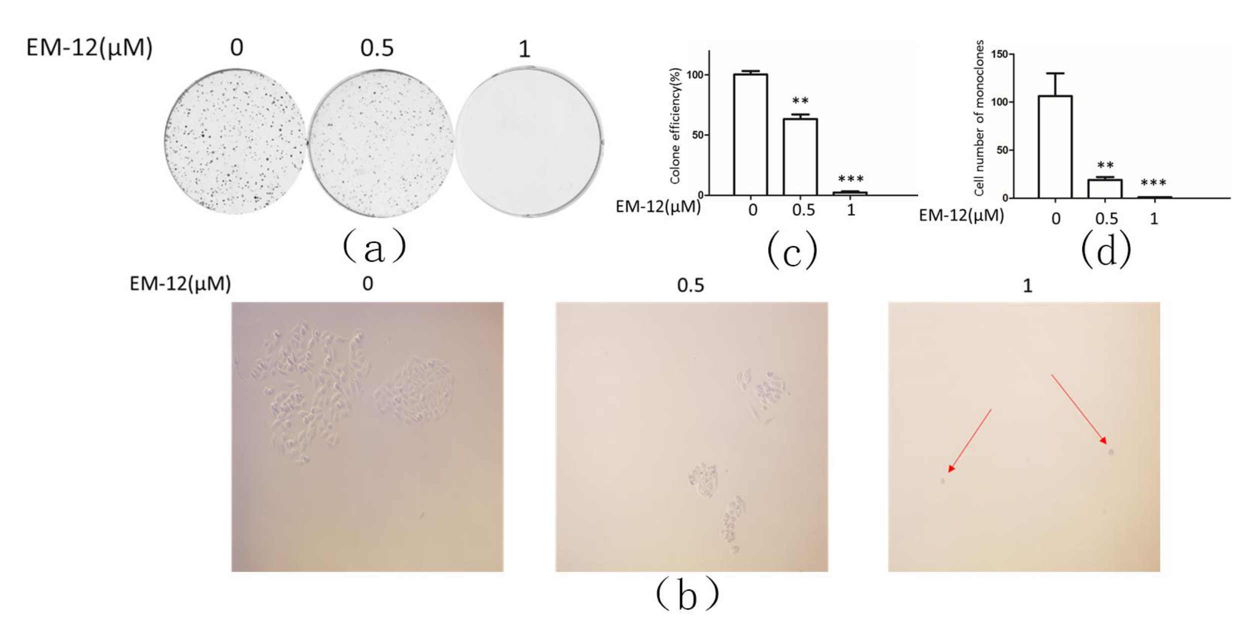


图 3 EM-12 对卵巢癌 2774-C10 细胞增殖能力的影响

Fig.3 Effect of EM-12 on colon formation of 2774-C10 cell

(a) EM-12 reduced colon formation of 2774-C10 cells (b)EM-12 reduced cell number of monoclones

(c) statistical analysis of colon formation (d) statistical analysis of cell number of monoclones

2.3 EM-12 诱导 2774-C10 细胞发生 G_1/S 期阻滞

为了检测 EM-12 所影响的信号通路，我们进行 RNA-seq 分析，以 EM-12 处理 2774-C10 细胞 24h 为实验组，DMSO 为对照组。GSEA 结果显示 EM-12 诱导

2774-C10 细胞发生 G_1/S 期阻滞，并且相关基因发生显著变化，见图 4(a)。为了进一步确认 EM-12 诱导 2774-C10 细胞发生 G_1/S 期阻滞，我们用流式细胞术检测细胞周期。流式细胞仪 PI 单染显示，不同浓度 EM-12 作用于 2774-C10 细胞后，随着 EM-12 浓度增加，G_1 期细胞比例增加，S 期细胞比例减少，G_2 期细胞比例变化不大，G_1/S 期比例逐渐增大，且 preG_1 期比例增加。提示 EM-12 诱导 2774-C10 细胞发生 G_1/S 期阻滞，见图 4(b)。

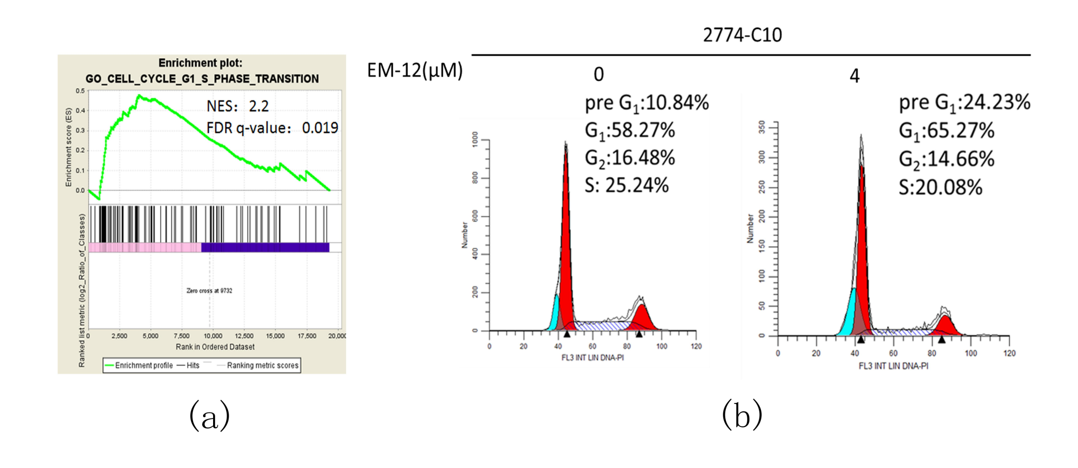


图 4 EM-12 对卵巢癌 2774-C10 细胞 G_1/S 期阻滞的影响

Fig.4 Effects of EM-12 on G_1/S cell cycle arrest of 2774-C10 cell

(a)GSEA result showing that gene set related to G1/S cell cycle arrest scores was enriched in EM-12 treated 2774-C10 cell

(b) Flow cytometry analysis showed an increase of the percentage of G1/S phase in a dose-dependent manner treated with EM-12

2.4 EM-12 诱导 2774-C10 细胞发生细胞凋亡

使用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡，将 2774-C10 细胞用不同浓度的 EM-12 进行处理 48h。结果显示，随着 EM-12 浓度的增加，凋亡率逐渐增加，见图 5。

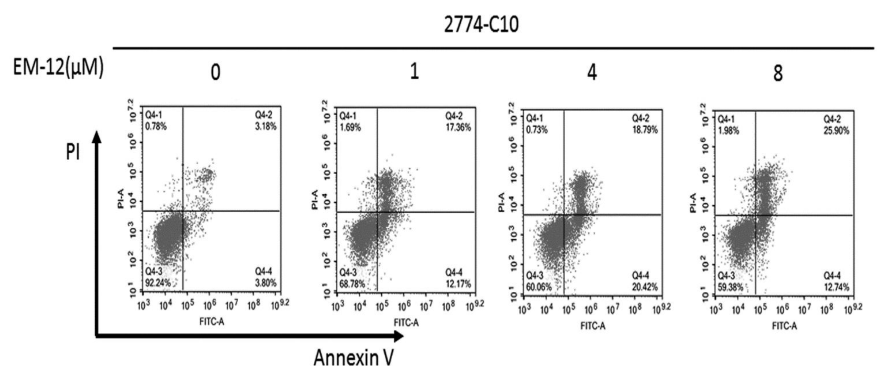


图 5 EM-12 对卵巢癌 2774-C10 细胞凋亡的影响

Fig.5 Effects of EM-12 on apoptosis of 2774-C10 cell

2.5 Western blotting 检测细胞周期相关蛋白的水平

GSEA 分析与流式细胞术周期分析发现 EM-12 可以诱导细胞发生 G_1/S 期阻滞，我们检测 G_1/S 期周期依赖性激酶 CDK2，CDK6；和 G_1/S 期转化调控点促进因子 cyclin D_1，cyclinE_2。结果显示，CDK2，CDK6，cyclinD_1，cyclinE_2 的蛋

白水平下降，见图 6(a ~f)。结果证明，EM-12 导致 2774-C10 细胞发生 G_1/S 期阻滞。

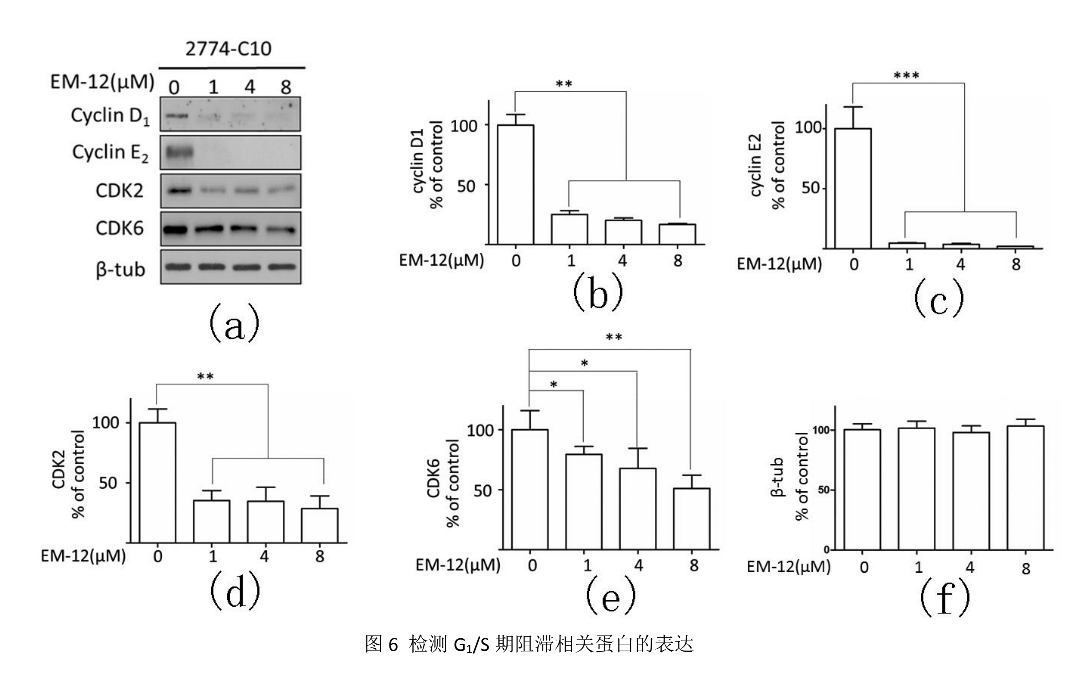


图 6 检测 G_1/S 期阻滞相关蛋白的表达

Fig.6 The expression of G_1/S cell cycle arrest-related proteins detected by the Western blotting

(a) G1/S cell cycle arrest-related proteins detected by the Western blotting (b～f) grey statistics of western blotting

2.6 Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白的水平

流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡发现，EM-12 诱导 2774-C10 细胞发生细胞凋亡。所以，我们进一步检测凋亡通路的相关蛋白的水平。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主，有序的死亡过程，它可以维持内环境的稳定。细胞凋亡的基本过程是细胞接受凋亡信号后，凋亡分子相互作用，促进蛋白水解酶 caspase 的活化，再进一步切割多聚 ADP 核糖聚合酶 PARP，最终启动细胞发生凋亡。结果提示，随着药物浓度的增加，caspase-8，caspase-3 活化，PARP 发生切割，见图 7(a ~e)。结果证明，EM-12 通过死亡受体通路介导 2774-C10 细胞凋亡。

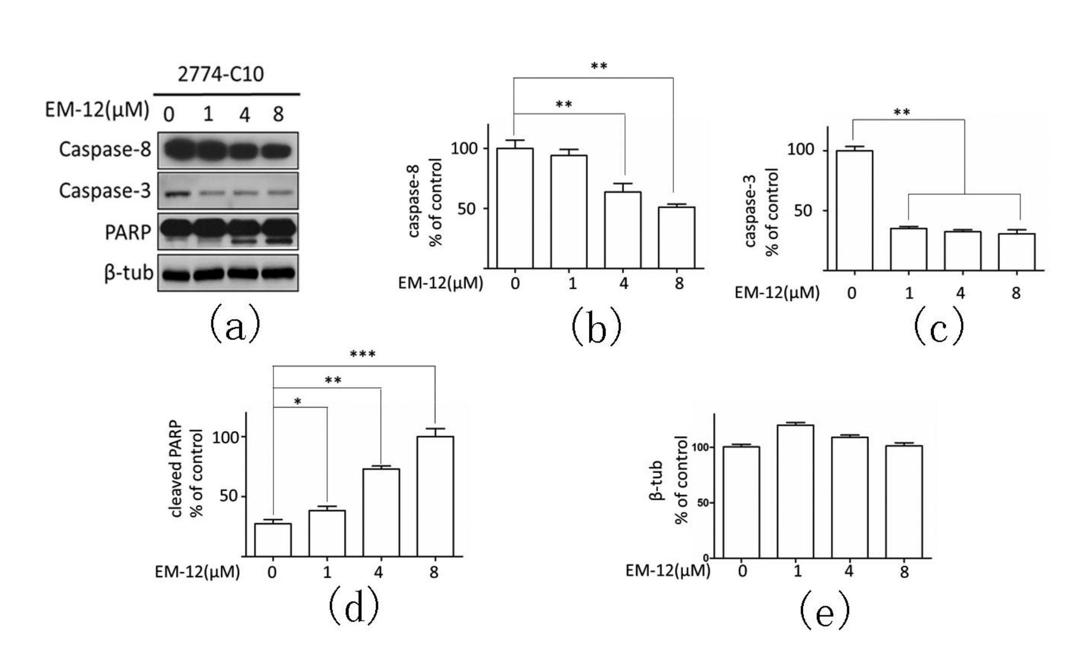


图 7 检测细胞凋亡相关蛋白的表达

Fig.7 The expression of apoptosis-related proteins detected by the Western blotting

(a) apoptosis-related proteins detected by the Western blotting (b～e) grey statistics of western blotting

3 讨论

白花地胆草（*Elephantopus mollis H.B.K.*）为菊科地胆草属植物，在我国主要分布于福建、广东等地[8-9]。其具有清热，解毒，凉血，利湿的功效。已有实验研究报道白花地胆单体 EM-3 和 EM-23 的抗肿瘤作用及其分子机制[6-7]。而其他的白花地胆草单体的抗肿瘤作用及其机制尚不明确。

EM-12 是本课题组是本课题组从白花地胆草乙醇提取物中提取的一种单体成分，关于 EM-12 化合物的抗肿瘤作用及其机制研究尚缺乏相关报道。本实验结果表明 EM-12 可以诱导卵巢癌 2774-C10 细胞发生 G_1/S 期阻滞,且通过死亡受体通路介导细胞凋亡。

在 DNA 损伤时，细胞周期 G_1/S 检验点可阻止细胞进入 S 期，从而时细胞有足够时间来修复损伤 DNA，维持细胞基因组的稳定[10]。在发生 G_1/S 期转换时，CDK4/6-Cyclin D 复合物可以促进 pRB 的磷酸化，pRB 发生磷酸化后构象改变且与 E2F 解离，使得 E2F 被激活，进一步起始 G_1/S 期转化的相关基因表达[11]。其中包括 cyclin E, cyclin E 与 CDK2 形成复合物，进一步促进 G_1/S 期转化[12-14]。本研究发现，EM-12 可以显著提高卵巢癌细胞 G_1 期比例，并发现 cyclin D_1，cyclin E_2，CDK2，CDK6 等蛋白水平下降，说明细胞被阻滞于 G_1 /S 期。

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主有序的死亡，包括死亡受体通路的外源性细胞凋亡、线粒体凋亡、和内质网压力介导的凋亡。其中，死亡受体通路的外源性性细胞凋亡是通过 TNF-α 与 TNFR1 结合，进而激活下游的 caspase-8，释放 caspase-8 的活化片段 p18 和 p10[15-16]。活化的 caspase-8 切割下游的 caspase-3，使 caspase-3 活化。最终激活的 caspase-3 导致 PARP 切割失活，最终导致凋亡[17-20]。本研究发现，EM-12 可以活化 caspase-8，caspase-3，并且使 PARP 切割失活，说明 EM-12 通过死亡受体通路介导细胞凋亡。

本文发现 EM-12 能抑制卵巢癌 2774-C10 细胞的增殖能力。发现 EM-12 可以阻滞细胞周期，诱导 2774-C10 细胞发生 G_1/S 期阻滞。此外，EM-12 还能通过死亡受体通路介导 2774-C10 细胞发生细胞凋亡。在治疗卵巢癌方面表现出良好的应用前景，这为白花地胆草单体 EM-12 的临床应用提供了更多的理论依据。

参考文献

[1] Shuo Chen, Xi Chen, Yin-Ling Xiu, et al. microRNA 490-3P enhances the drug-resistance of human ovarian cancer cells. Journal of Ovarian Research, 2014, 7: 84.

[2] Mantia-Smaldone GM, Edwards RP, Vlad AM. Targeted treatment of recurrent platinum-resistant ovarian cancer: current and emerging therapies. Cancer Management & Research, 2011, 3: 25.

[3] Jordan SJ, Siskind V, Green CA, et al. Breastfeeding and risk of epithelial ovarian cancer. Cancer Causes Control, 2010, 21(1): 109–116.

[4] 林镕，陈艺林,石铸．中国植物志(第 74 卷)．北京：科学出版社, 1987: 45.

Lin R, Chen YL, Shi Z. Flora Reipublicae Popluaris Sinicae (volume 74). Beijing: Sciences Press,

1987: 45.
[5] Liang N, Yang XX, Wang GC, et al. Study on the chemical constituents of Elephantopus mollis. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2012, 35(11): 1775-1778.
[6] 李振华,李翠平,张相强,等. EM-3 通过 stat3 通路诱导鼻咽癌细胞凋亡和 G2/M 期阻滞并降低 sp 细胞比例. 中国生物工程杂志,2016,03(36):1-10.
Li Zhen-hua, Li Cui-ping, Zhang Xiang-qiang, et al.EM3 Targets Stat3 to Induce Apoptosis, G2 /M Cell Cycle Arrest and Ｒeduce the Proportion of SP Cells in Nasopharyngeal Carcinoma. J Chin Biotechnol, 2016,03(36):1-10.
[7] Shao FY, Wang S, Li HY, et al. EM23, a natural sesquiterpene lactone, targets thioredoxin reductase to activate JNK and cell death pathways in human cervical cancer cells. Oncotarget, 2016, 7(6): 6790-808.
[8] 曹晖,陈文,毕培曦. 地胆草属药用植物的研究概述[J]. 国外医学(中医中药分册), 1998, 20(02):11-15.
Cao H, Chen W, Bi PX. An research overview of *Elephantopus scaber L.* medicinal plants[J]. Foreign Medical Sciences, 1998, 20(02):11-15.
[9] 王建军,刘宇婧,徐家星,等. 地胆草属药用植物研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(03): 401-415.
Wang JJ, Liu YJ, Xu JX, et al. research development of Elephantopus scaber L. medicinal plants[J]. Nat Prod Res Dev, 2013, 25(03): 401-415.
[10] C Bertoli, JM Skotheim, RAMD Bruin. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013, 14(8): 518.
[11] Y Tong, H Ying, R Liu, et al. Pin1 inhibits PP2A-mediated Rb dephosphorylation in regulation of cell cycle and S-phase DNA damage. cell death ＆ diease, 2015, 6(12): e1640
[12] Shi Y, Qian ZR, Zhang S, et al. Cell Cycle Protein Expression in Neuroendocrine Tumors: Association of CDK4/CDK6, CCND1, and Phosphorylated Retinoblastoma Protein With Proliferative Index. Pancreas. 2017, 46(10):1347-1353
[13] Li M, Xiao A, Floyd D, et al. CDK4/6 inhibition is more active against the glioblastoma proneural subtype. Oncotarget. 2017, 8(33):55319-55331
[14] Gookin S, Min M, Phadke H, et al. A map of protein dynamics during cell-cycle progression and cell-cycle exit. PLoS Biol. 2017, 15(9):e2003268
[15] Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. Immunol Rev. 2017, 277(1):76-89
[16] Feltham R, Vince JE, Lawlor KE. Caspase-8: not so silently deadly. Clin Transl Immunology. 2017, 6(1):e124
[17] Asweto CO, Wu J, Alzain MA, et al. Cellular pathways involved in silica nanoparticles induced apoptosis: A systematic review of in vitro studies. Environ Toxicol Pharmacol. 2017, 56:191-197
[18] Ling Y, Li X, Yu L, et al. Sevoflurane exposure in postnatal rats induced long-term cognitive impairment through upregulating caspase-3/cleaved-poly (ADP-ribose) polymerase pathway. Exp Ther Med. 2017, 14(4):3824-3830
[19] Danial N N, Korsmeyer S J. Cell death: critical control points. Cell, 2004, 116(2):205-219
[20] Nalluri S, Ghoshal-Gupta S, Kutiyanawalla A, et al. TIMP-1 inhibits apoptosis in lung adenocarcinoma cells via interaction with Bcl-2. PLoS One, 2015, 10(9): e0137673

Molecular Mechanism of Inducing 2774-C10 Cell Apoptosis and G_1/S cell cycle arrest by Ethanol Extract from *Elephantopus mollis H.B.K*

Huang xiang[1], Yang jie[1], He Pei-yan[1], Wu Zhi-hui[1], Zeng Hui-lan[2], Wang Xin-Ning[3**], Jiang Jian-wei[1**]

(1 Department of Biochemistry， Medical College， Jinan University， Guangzhou 510632， China)

(2 Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632， China)

(3 Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective: To investigate the antitumor mechanism of EM-12, an ethanol extracts from *Elephantopus mollis H.B.K*, in ovarian cancer. Methods: The effects of EM-12 on the cell viability of 2774-C10 and L02 cells were detected by MTT assay, and colony formation assay. Gene set enrichment analysis(GSEA) plots for EM-12 regulated gene, as determined by RNA-seq. Cell cycle was evaluated by PI single staining. Cell apoptosis was evaluated by Annexin V FITC/PI staining. Expressions of apoptosis-relative proteins， and cell cycle-relative in 2774-C10 cells were measured by Western blotting. Result: The cell viability of 2774-C10 was inhibited by EM-12 in a dose manner. Colony formation assays showed that EM-12 decreased colony formation compared with control. Flow cytometry analysis showed an increase of the percentage of apoptotic cells and G_1/S phase in a dose-dependent manner treated with EM-12. Gene set enrichment analysis(GSEA) result showed that the gene set related to G_1/S cell cycle arrest scores was enriched in EM-12 treated 2774-C10 cell. EM-12 downregulated the expression of Cyclin E_2, Cyclin D_1, CDK2, and CDK6 with different concentrations. In addition, active bands of Caspase-8, Caspase-3 and PARP could be detected using Western blotting. Conclusions: EM-12 induces the G_1/S cell cycle arrest. In addition, EM-12 induces apoptosis by death receptor pathway.

Key Words: *Elephantopus mollis H.B.K* ovarian cancer Apoptosis death receptor pathway G_1 /S cell cycle arrest